# بررسی شیمی ـ بافتی آوند چوبی در شاخه‌های پرتقال والنسیا [*Citrus sinensis* (L.) osb.] مبتلا به عارضه سبز خشک شدگی سرشاخه‌ها (گرسوم) در استان فارس

Histochemical studies on sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] branches affected by sudden wilt (Garsoom) in Fars province

**فرزانه فروهرفر* و هما رجائی**

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی و دانشگاه شیراز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

دریافت ۱۳۸۴/۲/۱۹ پذیرش ۱۳۸۷/۷/۱۷

**چکیده**

تغییرات آوند چوبی پسین در شاخه‌های پرتقال [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] واریته والنسیا پس از ابتلا به سبز خشک شدگی (گرسوم)، در مقایسه با شاخه سالم، مورد بررسی قرار گرفت و ماهیت شیمیایی گرفتگی‌های آوندی با استفاده از آزمایش‌های مختلف شیمی بافتی تعیین شد. مشاهدات بافتی، گرفتگی‌هایی به اشکال و حالات مختلف را در عناصر وسل شاخه‌های مبتلا نشان داد. در آزمایش‌های شیمی بافتی ترکیبی از کالوز، لیگنین، پروتئین و لیپیدها (اسیدی و خنثی) در هر دو نوع گرفتگی رشته‌ای و بی‌شکل تشخیص داده شدند. پاسخ گرفتگی آوندی به معرف های سلولز، همی سلولز، نشاسته و ترکیبات فنلی منفی بود. گرفتگی در برخی از سلولهای پارانشیم طولی مجاور وسل و پارانشیم شعاعی نیز مشاهده شد. گرسوم از ابعاد مختلف مطالعه قابل مقایسه با عارضه‌های مشابه در مرکبات سایر کشورها می‌باشد.

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

**واژه‌های کلیدی: خشکیدگی شاخه، آوند چوبی، مرکبات، شیمی بافتی**

**مقدمه**

عارضه سبز خشک شدن سرشاخه‌ها شبیه بیماری‌های ویروسی و شبه میکوپلاسمایی است که در اکثر نقاط مرکبات خیز استان گزارش شده است. (۸) این عارضه معمولاً در فصل پاییز ظاهر و ظرف مدت ۱٤-۱۰ روز پیشروی می‌کند و اصطلاح محلی آن عقرب زدگی یا گرسوم می‌باشد. علایم و میزان خسارت این عارضه در درختان پرتقال (والنسیا، ناول)، لیمو شیرین و نارنگی بارز است(۱۱، ۷).

در سایر نقاط جهان نیز خشک شدن شاخه ها و یا کل درخت مرکبات، به خصوص پرتقال، از مسائل مهم اقتصادی و پژوهشی به شمار می روند. شناخته شده ترین این عارضه ها Citrus Blight (CB) است که برای اولین بار در فلوریدا شناسائی و سپس در نقاط دیگر جهان نیز مشاهده شده است (۱۰، ۴).

عارضه های مشابهی، با توجه به محل وقوع آنها، تا کنون با نامهای Young Tree Decline (YTD)، Sand Hill Decline (SHD)، Citrus Blight-Like Decline، Citrus Decline، Sudden Decline، Declinamiento گزارش شده اند (۱۶، ۱۴، ۱۳، ۶، ۱). این عارضه ها همه ساله بالغ بر ۱۰ میلیون درخت مرکبات را از بین می برند و تا کنون هیچ بیمارگری به جزء *Xylella fastidiosa* که به عنوان عامل بلایت (CB) شناسایی و معرفی شده است، عامل یا عوامل مولد آن‌ها ناشناخته باقی مانده‌اند (۶ و ۱۴).

پژوهشهای قبلی انجام شده برروی مرکبات استان فارس نشان داده است که عارضه گرسوم از لوله شدن برگهای سبز و شاداب آغاز شده، ظرف مدت کوتاهی به خشکیدگی کامل شاخه و ریزش قبل از موعد میوه ختم می‌شود. در مقایسه بافتی شاخه‌های سالم و مبتلا گرفتگی‌هایی در عناصر آوند چوبی، به‌خصوص آوند پسین گزارش شده که رابطه مستقیم بین افزایش تدریجی گرفتگی‌ها و مراحل پیشرفت عارضه را داشته است(۱۱، ۷).

پژوهش حاضر با هدف شناسایی ترکیب شیمیایی گرفتگی‌ها در آوند چوبی پسین شاخه‌های مبتلا به گرسوم انجام شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

**روش بررسی**

**الف) نمونه‌برداری**

نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق از شاخه‌های پرتقال والنسیا [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] مربوط به باغ‌های استان فارس از جمله شیراز، جهرم، خفر و قیروکارزین بودند که طی بازدیدهای مرتب در سه سال متوالی در فصل پاییز، از درختان سالم و مبتلا، جمع‌آوری شدند. تغییرات ظاهری درختان مبتلا به گرسوم در مراحل مختلف پیشرفت عارضه، در مقایسه با درختان سالم، ثبت شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند.

**ب) مطالعات بافتی و شیمی بافتی**

نمونه‌ها حداقل به مدت دو هفته در محلول F.A.A (فرمالین، اسیداستیک، الکل اتیلیک) تثبیت شدند و برشگیری از نمونه‌های سالم و مبتلا (در مرحله پیشرفته عارضه) با استفاده از دستگاه میکروتوم لغزشی، با گرفتن برش‌هایی به ضخامت ۱۵-۱۰ میکرومتر، انجام شد. دلیل انتخاب نمونه‌های مبتلا از مرحله پیشرفته عارضه جهت انجام آزمایشات شیمی ـ بافتی، وجود بیشترین تعداد گرفتگی آوندی در این مرحله نسبت به مراحل قبلی پیشرفت عارضه بوده است (۱۱، ۷ ). تعدادی از برش‌های مربوط به نمونه‌های سالم و مبتلا جهت مطالعات بافتی، بدون رنگ‌آمیزی در میکروسکوپ نوری بررسی و تعدادی دیگر جهت انجام آزمایش‌های شیمی ـ بافتی بمنظور شناسایی ماهیت شیمیایی گرفتگی‌های آوندی به شرح زیر آماده شدند.

**۱- تعیین کربوهیدرات‌های تام (کل):** در ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه توسط اسید پریودیک اکسید و پس از شستشو با آب مقطر، ۲۰ دقیقه در معرض معرف شیف قرار داده شدند و پس از شستشوی مجدد با آب مقطر، مشاهده گردیدند. با این روش کربوهیدرات‌ها درصورت وجود، به رنگ صورتی تا قرمز مایل به ارغوانی در می‌آیند(۹ ، ۲).

**۲- تعیین کالوز:** (روش آبی آنیلین ـ با نور قابل رؤیت) : نمونه‌ها ابتدا در محلول ۰/۰۰۵ درصد آبی آنیلین در الکل ۵۰ درصد، به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر مشاهده شدند. کالوز درصورت وجود آبی رنگ می‌شود(۹، ۲).

**۳- تعیین سلولز و همی سلولز:** از واکنش روی ـ کلر ـ ید برای تعیین سلولز و همی سلولز استفاده شد. برای تهیه این محلول ۵۰ گرم کلرید روی و ۱۶ گرم یدور پتاسیم در ۱۷ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردیده و ید اضافی به محلول افزوده شد. پس از چند روز قسمت رویی

Archive of SID

www.SID.ir

محلول جمع‌آوری و از آن برای شناسایی سلولز و همی سلولز استفاده شد. به این ترتیب که نمونه‌ها مدتی در چند قطره از محلول فوق قرار گرفتند. درصورت وجود سلولز و همی‌سلولز آن نواحی به رنگ آبی دیده می‌شوند (۹، ۵).

**٤- تعیین نشاسته:** نمونه‌ها به‌مدت ۲-۱ دقیقه در محلول ید، یدور پتاسیم قرار داده شدند. نشاسته‌های تازه ساخته شده درصورت وجود، به رنگ قرمز تا بنفش و نشاسته‌های قدیمی‌تر به رنگ آبی تا سیاه مشاهده می‌شوند. جهت ساخت محلول فوق ۲ گرم یدور پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردیده و سپس ۰/۲ گرم ید به محلول حاصل اضافه شد (۹).

**٥- تعیین کل لیپیدها:** ابتدا نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در محلول یک درصد آبی نیل در دمای ۳۷°C رنگ شده و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در محلول یک درصد اسید استیک قرار گرفتند و پس از شستشو با آب مقطر مشاهده گردیدند. در مجاورت این معرف لیپیدهای خنثی مثل موم و روغن به رنگ قرمز و لیپیدهای اسیدی مثل اسیدهای چرب آزاد و فسفوگلیسریدها به رنگ آبی در می‌آیند (۹).

**٦- لیپیدهای اسیدی:** جهت شناسایی لیپیدهای اسیدی ابتدا نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۵۰ درصد قرار گرفته و سپس ۱ دقیقه در محلول اشباع و صاف شده سودان سیاه بی (Sudan Black B)در الکل اتیلیک ۷۰ درصد، قرار داده شدند و پس از شستشوی دقیق با آب مقطر، مشاهده گردیدند. لیپیدهای اسیدی بایستی به رنگ آبی ظاهر شوند(۹، ۵، ۲).

**۷- لیپیدهای خنثی:** این آزمایش مشابه با آزمایش تشخیص لیپیدهای اسیدی انجام شد با این تفاوت که بجای استفاده از محلول اشباع سودان سیاه بی از محلول اشباع شده سودان چهار (Sudan IV) در الکل اتیلیک ۷۰ درصد استفاده شد. لیپیدهای خنثی در این آزمایش به رنگ نارنجی تا قرمز ظاهر خواهند شد(۹، ۵، ۲).

**۸- کل پروتئین‌ها:** نمونه‌ها ابتدا در محلول ۵ درصد ناین هیدرین در الکل مطلق به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷°C قرار داده شدند و پس از دو تعویض متوالی در الکل مطلق و یک تعویض در آب مقطر، به مدت ۳۰ دقیقه در معرف شیف قرار گرفتند. سپس ۱ دقیقه در محلول سدیم بیسولفیت ۲ درصد قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر، مشاهده شدند. پروتئینها درصورت وجود، به رنگ قرمز متمایل به بنفش مشاهده خواهند شد(۹).

Archive of SID

www.SID.ir

**۹- ترکیبات فنلی (تانن‌ها):** نمونه‌ها در محلول ۱ درصد کلرید آهن در اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به مدت ۱ ساعت قرار گرفته و پس از شستشو مشاهده شدند. تشکیل رسوب آبی در این آزمایش دلالت بر حضور تانن دارد(۹).

**۱۰- لیگنین:** جهت شناسایی این ترکیب یک قطره از محلول آبی اشباع شده فلوروگلوسینول در اسید کلریدریک ۲۰ درصد برروی نمونه‌ها ریخته شد. لیگنین درصورت وجود، بایستی به رنگ قرمز متمایل به ارغوانی درآید(۹، ۲).

آزمایش‌های تشخیصی فوق، در مورد با سه گروه اصلی ترکیبات یعنی کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها بدون تثبیت نمونه‌ها در F.A.A نیز صورت گرفت تا تأثیر یا عدم تأثیر محلول تثبیت‌کنندهٔ برروی ماهیت شیمیایی گرفتگی‌ها کنترل شود. پس از انجام آزمایش‌ها، نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مدل Zeiss photomicroscope III مجهز به دوربین Wild-MP55 مشاهده و عکسبرداری شدند.

## نتیجه

در این پژوهش درختان پرتقال والنسیا مبتلا به عارضه گرسوم، در ابتدا بطور مقدماتی از لحاظ تغییرات ظاهری و بافتی سپس از لحاظ شیمی ـ بافتی در مقایسه با درختان سالم مورد بررسی قرار گرفتند.

تغییرات ظاهری در درختان مبتلا عبارت بودند از: لوله شدن برگهای سبز و شاداب و ریزش آنها، تغییر رنگ و خشک شدن سرشاخه‌ها، ترک خوردگی در محل گره یا میانگره، خروج صمغ از محل ترک خوردگی و نهایتاً ریزش قبل از موعد میوه‌ها.

تغییرات بافتی عمدتاً شامل وجود گرفتگی‌هایی به اشکال مختلف رشته‌ای (Filamentous plug) و بی شکل (Amorphous plug) به رنگ‌های طلایی تا زرد در عناصر وسل آوند چوبی پسین بود. شکل ۱ چند وسل در درخت سالم و شکل ۲ این عناصر را که حاوی گرفتگی هستند، در درخت مبتلا نشان می‌دهد.

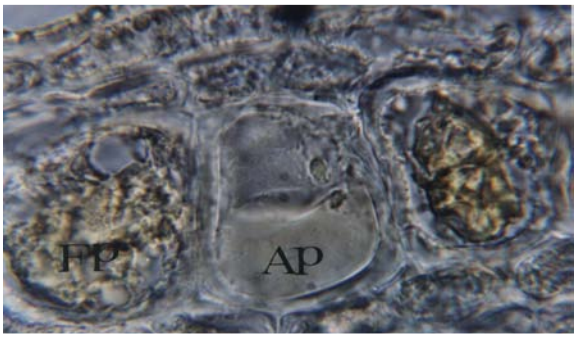
به دنبال مشاهدات ظاهری و بافتی، به منظور شناسایی ماهیت شیمیایی انواع گرفتگی‌های آوندی، آزمایش‌های شیمی ـ بافتی مختلفی انجام شدکه نتایج به شرح زیر می‌باشد:

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- برش عرضی شاخه درخت سالم پرتقال والنسیا. عناصر آوندی وسل (Vm) فعال و بطور طبیعی فاقد هرگونه گرفتگی می‌باشند (۱۳۰۰ ×).

Fig. 1. Transection of xylem in healthy sweet orange trees. Vessel members (Vm) lack occulusions. (×1300).



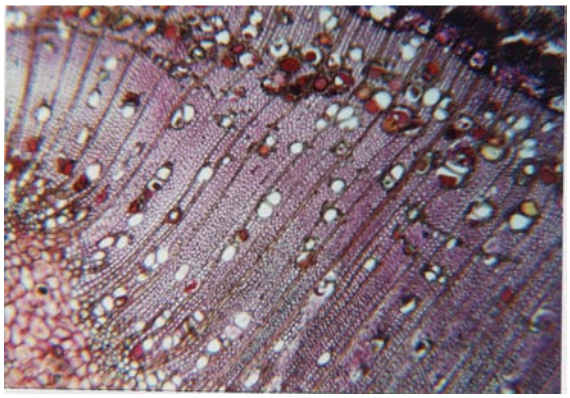

شکل ۲- برش عرضی شاخه درخت مبتلا به گرسوم. وسل‌ها حاوی گرفتگی‌های رشته‌ای (FP) ، بی‌شکل (AP) و یا ترکیبی از هر دو نوع گرفتگی هستند (۱۳۰۰ ×).

Fig. 2. Transection of xylem in wilting branches. Vessel members are occluded with filamentous (FP), amorphous plugs (AP) or a mixture of the two types. (×1300).

Archive of SID

www.SID.ir

در آزمایش تشخیص کل کربوهیدراتها دو نوع گرفتگی آوندی رنگهای مختلفی از زرد تا ارغوانی به خود گرفتند یعنی برخی نسبت به معرف پاسخ مثبت و برخی پاسخ منفی دادند (شکل ۳). علاوه بر وسل‌ها بعضی از سلول‌های پارانشیمی طولی مجاور وسل، پارانشیم شعاعی و فیبر آوند چوبی نیز دارای گرفتگی‌هایی بودند که تعدادی از آنها به معرف فوق پاسخ مثبت دادند (شکل ٤).



شکل ۳- شناسایی کل کربوهیدراتها توسط معرف شیف و اسید پریودیک. هر دو نوع گرفتگی آوندی طیفی از رنگهای زرد (بدون تغییر رنگ) تا ارغوانی (با تغییر رنگ مخصوص این معرف) را نشان می‌دهند (٤٢ ×).

Fig. 3. Total carbohydrates test with periodic acid-schiff's reagent. Both types of plugs show a gradient of reactions, from negative to positive. (×42).

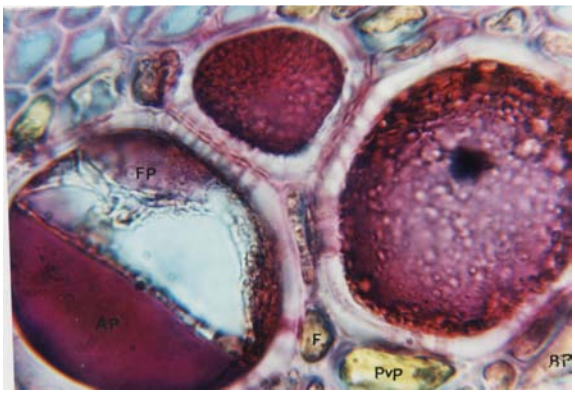
در آزمایش تشخیص کالوز، برخی از گرفتگی‌های بی‌شکل و رشته‌ای به رنگ آبی درآمدند که وجود این ترکیب را نشان می‌داد. بعضی دیگر، از هر دو نوع گرفتگی، بدون تغییر رنگ باقی‌ماندند که نشانگر عدم وجود این ترکیب بود (شکل ۵).

در آزمایش تشخیص سلولز و همی‌سلولز، هیچ تغییر رنگی به آبی روشن تا تیره که دلالت بر وجود این ترکیبات دارد، در هیچکدام از انواع گرفتگی‌ها مشاهده نشد و گرفتگی‌ها به رنگ

Archive of SID

www.SID.ir

زرد متمایل به قهوه‌ای مشاهده شدند (شکل ٦).




شکل ٤- شناسایی کل کربوهیدراتها توسط معرف شیف و پریودیک اسید. علاوه بر وسل‌ها، در پارانشیم مجاور وسل (PVP) ، پارانشیم شعاعی (RP) و فیبر (F) نیز گرفتگی مشاهده شد. در این شکل ترکیبی از هر دو نوع گرفتگی رشته‌ای و بی‌شکل در وسل سمت چپ مشاهده می‌شود (۱۳۰۰ ×).

Fig. 4. Total carbohydrates test. Para vascular parenchyma cell (PVP), Radial parenchyma (RP) and fiber cells (F) are also occluded. Both types of plugs are found in left vessel member (×1300).

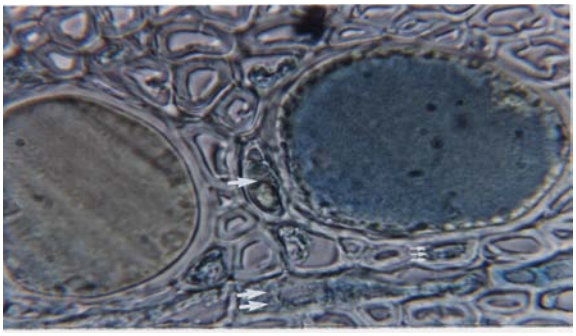
در آزمایش تشخیص نشاسته گرفتگی‌ها به رنگ طبیعی خود در آوند چوبی باقی‌ماندند و تغییر رنگ مخصوص این ترکیب را در مجاورت معرف نشان ندادند (شکل ۷).

در آزمایش شناسایی کل لیپیدها هر دو نوع گرفتگی آوندی به رنگ آبی روشن تا تیره درآمدند. یعنی صرفاً تغییر رنگ مخصوص لیپیدهای اسیدی را از خود نشان دادند (شکل ۸). علاوه بر بررسی لیپیدها بطورکلی (لیپید کل یا تام)، آزمایش تشخیص این ترکیبات به تفکیک، با روشهای مختلفی صورت گرفت.

در آزمایش تشخیص لیپیدهای اسیدی جهت شناسایی فسفوگلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد، هر دو نوع گرفتگی آوندی به رنگهای خاکستری تا آبی تیره مایل به سیاه درآمدند و پاسخ مثبت به معرف این ترکیبات دادند (شکل ۹).

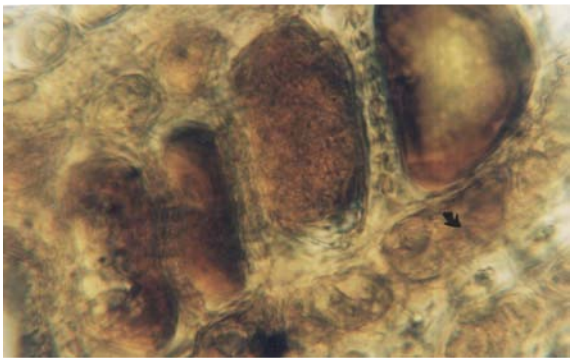
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- شناسایی کالوز با استفاده از معرف آبی آنیلین. برخی از گرفتگی‌ها پاسخ مثبت داده و بعضی بدون تغییر رنگ باقی ماندند. گرفتگی‌ها در سلولهای پارانشیمی و فیبر با پیکان مشخص شده‌اند (۱۳۰۰ ×).

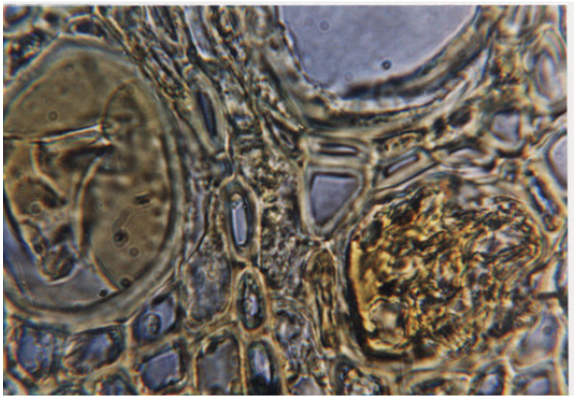
Fig. 5. Callose diagnosis test, with aniline blue. Some plugs react positively and some remain unchanged. Arrows indicate plugs in parenchyma and fiber cells. (×1300).



شکل ٦- شناسایی سلولز و همی‌سلولز با استفاده از معرف روی ـ کلر ـ ید. تغییر رنگ مخصوص این ترکیبات در هیچکدام از گرفتگی‌های آوندی مشاهده نشد. پیکان گرفتگی را درپارانشیم مجاور وسل نشان می‌دهد(۱۳۰۰ ×).

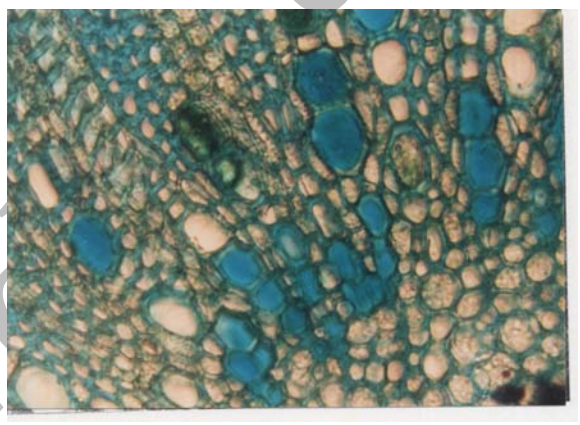
Fig. 6. Cellulose and hemicellulose diagnosis test, with Zn-Cl-I. None of the vessel plugs react positively. Arrow indicates plugging in vessel associated parenchyma cell. (×1300)

www.SID.ir



شکل ۷– شناسایی نشاسته با استفاده از معرف ید، یدور پتاسیم. هر دو نوع گرفتگی به این معرف پاسخ منفی داده وبدون تغییر رنگ باقی ماندند (۱۳۰۰ ×).

Fig. 7. IKI test for starch. None of the plugs react positively. (×1300).



شکل ۸– شناسایی کل لیپیدها توسط معرف آبی نیل. انواع گرفتگی‌ها به رنگ آبی روشن تا تیره درآمده و تغییر رنگ مخصوص لیپیدهای اسیدی را از خود نشان دادند (۲۰۸ ×).

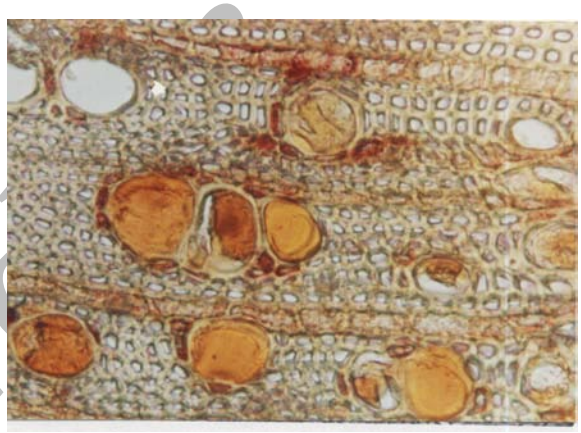
Fig. 8. Nile blue test for total lipids. Plugging materials are stained from pale to dark blue; typical of acidic lipids. (×208).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۹- شناسایی لیپیدهای اسیدی توسط معرف سودان سیاه بی . هر دو نوع گرفتگی به رنگ آبی تا خاکستری تیره مشاهده شدند (۵۲۰ ×).

Fig. 9. Diagnosis test for acidic lipids, with Sudan black B. Both types of occlusions are stained from blue to dark grey. (×520).



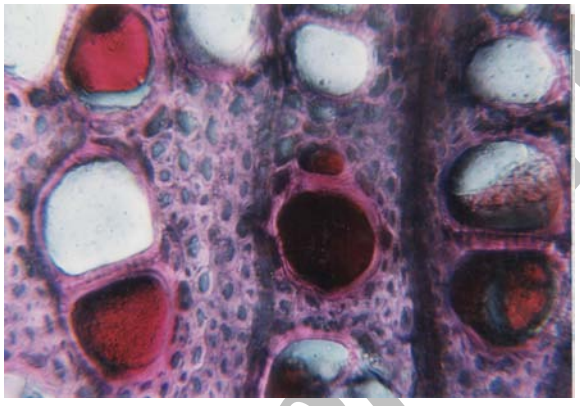
شکل ۱۰- تشخیص لیپیدهای خنثی توسط معرف سودان چهار. هر دو نوع گرفتگی به رنگ نارنجی متمایل به قرمز مشاهده شدند (۲۰۸ ×).

Fig. 10. Positive reaction of xylem occlusions to Suddan IV staining for neutral lipids. Amorphous and filamentous plugs are orange to red. (×208).

Archive of SID

www.SID.ir

در آزمایش تشخیص لیپیدهای خنثی جهت شناسایی موم و روغن، هر دو نوع گرفتگی نسبت به معرف مورد استفاده پاسخ مثبت داده و به رنگ نارنجی مایل به قرمز ظاهر شدند (شکل ۱۰).



تصویر ۱۰- تشخیص لیپیدهای خنثی توسط معرف سودان چهار. هر دو نوع گرفتگی به رنگ نارنجی متمایل به قرمز مشاهده شدند (۲۰۸ ×).

Fig. 10. Positive reaction of xylem occlusions to Suddan IV staining for neutral lipids. Amorphous and filamentous plugs are orange to red. (×208).

در آزمایش شناسایی کل پروتئینها هر دو نوع گرفتگی به معرف پاسخ مثبت داده و به رنگ قرمز مایل به بنفش درآمدند (شکل ۱۱).

هیچکدام از گرفتگی‌های آوندی پاسخ مثبت به معرف ترکیبات فنلی (تانن‌ها) نداده و بدون تغییر رنگ باقی ماندند (شکل ۱۲).

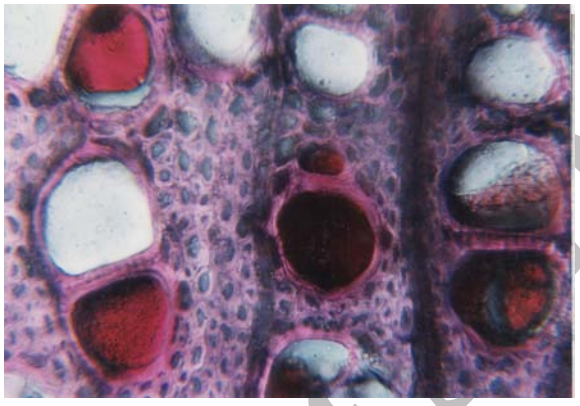
در آزمایش تشخیص لیگنین، هر دو نوع گرفتگی آوندی به رنگ قرمز متمایل به بنفش درآمدند و به معرف این ترکیب پاسخ مثبت دادند (شکل ۱۳).

پس از انجام آزمایش‌های فوق بمنظور بررسی این موضوع که آیا تثبیت کننده (F.A.A) تأثیری برروی ماهیت شیمیایی گرفتگی‌های آوندی داشته یا خیر، بررسی تکمیلی در زمینه سه گروه اصلی ترکیبات یعنی کربوهیدراتها، لیپیدها و پروتئین‌ها بدون تثبیت نمونه‌ها نیز انجام شد

Archive of SID

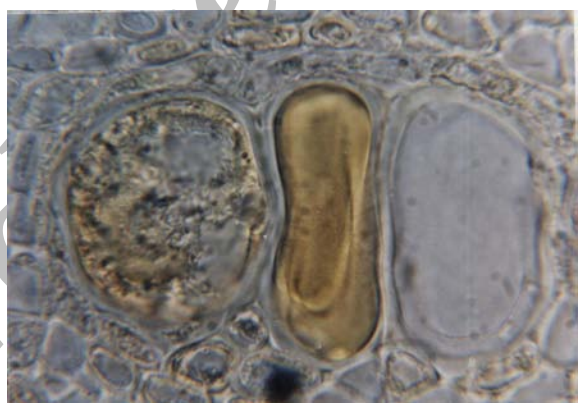
www.SID.ir

و پاسخ همهٔ موارد دقیقاً مشابه با واکنش آنها نسبت به معرفها پس از تثبیت، توسط F.A.A بود.



تصویر ۱۱- شناسایی کل پروتئینها توسط نایَن هیدرین و معرف شیف. هر دو نوع گرفتگی به رنگ قرمز متمایل به بنفش درآمدند (۵۲۰ ×).

Fig. 11. Ninehydrine-Schiff's reagent test for total proteins. Both types of plugs are stained red to violet. (×520).

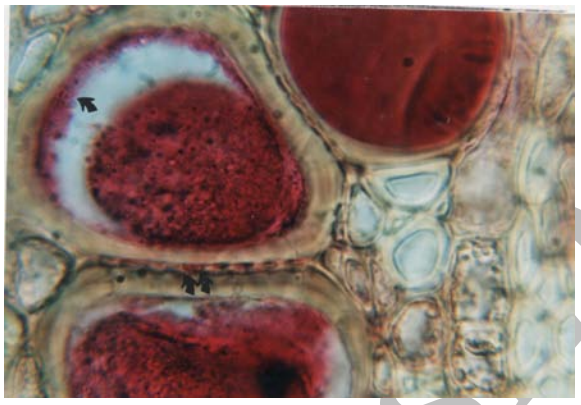


تصویر ۱۲- شناسایی ترکیبات فنلی (تانن‌ها) توسط کلریدآهن. هر دو نوع گرفتگی بدون تغییر رنگ مشاهده شدند (۱۳۰۰ ×).

Fig. 12. Diagnosis test for phenolic compounds, with Ferric chloride. None of the plug types reacts positively. (×1300).

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر ۱۳- شناسایی ترکیبات لیگنینی با استفاده از معرف فلوروگلوسینول. هر دو نوع گرفتگی به رنگ قرمز درآمدند. پیکان یک گانه گرفتگی اندک را در کنار دیواره نشان میدهد و پیکان دوگانه گرفتگی را در لان (pit) نشان میدهد (۱۳۰۰ ×).

Fig. 13. Lignin diagnosis test, with phloro-glucinol. Amorphous and filamentous plugs react positively. Note the slight plugging near a vessel wall (arrowhead) and occlusions in the pits (double arrowhead). (×1300).

نتایج حاصل از آزمایشات شیمی – بافتی و شباهت ترکیبات شیمیائی گرفتگی‌های آوندی رشته‌ای و بی‌شکل در جدول ۱ خلاصه شده است.

**بحث**

نتایج حاصل از مطالعات انجام شده برروی درختان پرتقال والنسیا مبتلا به عارضه گرسوم در استان فارس، از جهات مختلف قابل مقایسه با نتایج گزارش شده توسط محققین دیگر در رابطه با عارضه‌های خشکیدگی مرکبات در نقاط مختلف جهان می‌باشد (۲، ۶).

تغییرات ظاهری ایجاد شده در درختان مبتلا به عارضه گرسوم عبارتند از : ریزش برگها، کاهش تعداد و اندازهٔ میوه و ریزش قبل از موعد آنها و پژمردگی درخت. برخی از این تغییرات در رابطه با بیماری‌های گروه Blight نیز توسط محققین دیگر گزارش شده است. شاخه‌های درختان مبتلا به گرسوم ممکن است در سال بعد این علائم را نشان ندهند. اما در

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری‌های گروه Blight اکثر درختان کاملاً خشکیده و از بین می‌روند(۱۳، ٦، ۱).

جدول ۱- خلاصه نتایج آزمایش‌های شیمی ـ بافتی انجام شده برروی انواع گرفتگی‌های آوندی در شاخه خشکیده درخت پرتقال مبتلا. پاسخ مثبت و منفی انواع گرفتگی‌ها به معرف شیمی ـ بافتی مورد نظر به ترتیب با علامت + و - نشان داده شده است

Table 1. Suumary of the histochemical staining reactions of both types of xylem occlusions in wilting sweet orange branches. + & - indicate positive and negative reactions

| ترکیب موردشناسایی | معرف شیمی ـ بافتی | پاسخ گرفتگی رشته‌ای به معرف | پاسخ گرفتگی بی‌شکل به معرف |
|---|---|---|---|
| ۱- کربوهیدراتها (total) | Schiff's reagent periodic acid | ± | ± |
| ۲- لیپیدها (total) | Nile blue | ± | ± |
| ۳- پروتئینها (total) | Ninehydrine-Schiff's reagent | + | + |
| ٤- کالوز | Aniline blue | ± | ± |
| ٥- سلولز و همی سلولزها | Zinc-Chloro-Iodide | – | – |
| ٦- نشاسته | IKI reaction | – | – |
| ۷- لیپیدها (acidic) | Sudan black B | + | + |
| ۸- لیپیدها (neutral) | Sudan IV | + | + |
| ۹- ترکیبات فنلی (تانن‌ها) | Ferric chloride | – | – |
| ۱۰- لیگنین | Phloroglucinol | + | + |

تغییرات بافتی در درخنان پرتقال والنسیا مبتلا به عارضه عمدتاً شامل تغییر در بافت آوند چوبی پسین و وجود گرفتگی‌هایی به اشکال و رنگهای مختلف در عناصر آوندی می‌باشد که قبل از بروز علایم کامل پژمردگی در درخت تشکیل می‌شوند. بطوریکه برخی از عناصر آوند چوبی در شاخه‌های پژمرده در اثر انسداد توسط اجسام رشته‌ای یا بی‌شکل، غیر فعال می‌گردند برخی از محققین وجود این گرفتگی‌ها و اختلاف در حالت و رنگ‌آنها را در عناصر آوندی پسین درختان مبتلا به CB وعارضه های مشابه آن گزارش کرده‌اند(١٦، ١٥، ١٠، ٦، ٥).

Archive of SID

www.SID.ir

در پژوهش حاضر روشهای رنگ‌آمیزی متعددی بمنظور شناسایی ماهیت شیمیایی گرفتگی‌های آوندی در درختان مبتلا به گرسوم صورت گرفت. از نتایج بدست آمده چنین برمی‌آیدکه ماهیت شیمیایی گرفتگی‌های آوندی رشته‌ای و بی‌شکل در برخی موارد باهم مشابه می‌باشد. با توجه به مشاهدهٔ هر دو نوع گرفتگی در یک عنصر آوندی که در شکل‌های ۲ و ٤ مشخص می‌باشد، اختلاف در پاسخ به یک معرف بخصوص می تواند مربوط به مراحل تدریجی تشکیل و تجمع گرفتگی ها در عناصر آوندی باشد (۱۲).

در آزمایش شناسایی کربوهیدراتها بصورت کلی، با توجه به شکل۳، هر دو نوع گرفتگی درجات مختلفی از تغییر رنگ را از زرد تا ارغوانی نشان دادند. پاسخ مثبت بعضی از گرفتگی‌ها و پاسخ منفی برخی دیگر احتمالاً بدلیل تغییر ماهیت کربوهیدراتی آنها در زمانهای مختلف تشکیل می‌باشد. آزمایش‌های تشخیصی دیگر شباهت بین ترکیب گرفتگی‌ها را بیشتر مشخص ساخت. پاسخ گرفتگی‌های آوندی به معرف‌های سلولز، همی‌سلولز و نشاسته منفی بود و در رابطه با کالوز تعدادی از هر دو نوع گرفتگی پاسخ مثبت و تعدادی پاسخ منفی دادند و در رابطه با شناسایی لیگنین هر دو نوع گرفتگی به معرف این ترکیب پاسخ مثبت دادند. نتایج آزمایش‌های شیمی ـ بافتی Beretta و همکاران (۲) و Vandermolen و همکاران (۱۵) در رابطه با عارضه Citrus Blight و Declino نیز، دلالت بر وجود لیگنین و ترکیبات پکتیکی و عدم وجود سلولز، همی‌سلولز و نشاسته در گرفتگی‌های آوندی رشته‌ای و بی‌شکل دارد. همچنین این محققین اعلام کرده‌اندکه کالوز در ترکیب گرفتگی‌های رشته‌ای وجود ندارد ولی در گرفتگی‌های بی‌شکل موجود است.

در آزمایش‌های تشخیص لیپیدها، پاسخ گرفتگی‌های آوندی درختان پرتقال والنسیا مبتلا به گرسوم، نسبت به معرف هر دو نوع لیپیدهای اسیدی و خنثی مثبت بود و در آزمایش شناسایی کل لیپیدها، انواع گرفتگی‌ها به رنگ آبی روشن تا آبی تیره درآمدند یعنی تغییر رنگ مخصوص لیپیدهای اسیدی را نشان دادند. و پاسخ مثبت قطعی برای واکنش کل لیپیدها نسبت به معرف آبی نیل بدست نیامد Vandermolen و همکاران نیز این واکنش لیپیدها را در مورد CB و YTD در فوریدا گزارش کرده اند (۱۵).

شاخه های پرتقال مبتلا به گرسوم به آزمایش تشخیصی کل پروتئین ها واکنش مثبت

Archive of SID

www.SID.ir

نشان دادند که با نتایج شیمی بافتی گزارش شده در مورد CB مطابقت دارد (۱۵، ۲). پژوهش‌های جدید ملکولی تعدادی پروتئین که به نام Blight Associated Proteins (PAB) نامیده شده و تنها در آوند چوبی درختان مبتلا به CB تجمع می یابند را مشخص نموده اند. دو نوع از این پروتئین های وابسته به CB (P35 و P12) از فلوریدا گزارش شده اند (۱۴) و P12 نیز اخیراً در رابطه با CB از استرالیا گزارش شده است (۳). آزمایش های سرولوژیک مشابه می توانند ماهیت ملکولی پروتئین های مشاهده شده در عناصر آوند چوبی در پژوهش حاضر را مشخص نموده و شباهت احتمالی بین گرسوم و CB را بهتر نشان دهند.

در بررسی های انجام شده با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، گرفتگی های آوندی در لان (pit) موجود در دیواره های جانبی و سل ها نیزدر درختان مرکبات مبتلا به گرسوم گزارش شده اند (۱۲). مواد مسدود کننده ممکن است از طریق pit پارانشیم مجاور به طرف عناصر آوندی مهاجرت نمایند. همچنانکه Nemec (۱۰ ) در مورد عارضه CB اشاره کرده است. این مواد همچنین احتمال دارد از تورم و تجزیه دیواره های اولیه و تیغه میانی حاصل شوند، همچنانکه رجائی (۱۲) در مورد خشکیدگی شاخه لیمو شیرین مبتلا به گرسوم در فارس و Vandermolen و همکاران (۱۵) در مورد پرتقال مبتلا به YTD در فلوریدا عنوان نموده اند. مطالعات تکمیلی فراساختاری و شیمی – سلولی خواهند توانست مکان دقیق و چگونگی تشکیل مرحله به مرحله گرفتگی های آوندی را روشن نمایند.

شاخه های پرتقال والنسیا در مرحله پیشرفته عارضه گرسوم دارای صمغ بودند. خروج صمغ می تواند دلالت بر آسیب دیدگی و یا گرفتگی آوند آبکشی داشته باشد. بررسی های بافتی قبلی تنها فشرده شدن سلولهای منطقه آبکشی دز شاخه مرکبات مبتلا به گرسوم را نشان داده اند (۱۱). تغییرات احتمالی ایجاد شده در عناصر آوند آبکشی (stm) و رابطه آنها با خروج صمغ، در عارضه گرسوم، با بررسی های فراساختاری تکمیلی روشن خواهد شد.

تغییرات ظاهری شاخه های خشکیده پرتقال والنسیا، ساختار میکروسکوپی گرفتگی های آوندی و ماهیت شیمیایی آنها، حاکی از شباهت عارضه گرسوم فارس با CB فلوریدا و عارضه‌های مشابه با آن در دیگر نقاط جهان است. در عین حال، آزمایش های تشخیصی خاص CB، از جمله مقایسه میزان عنصر روی در bark شاخه های سالم و مبتلا، درجه این

Archive of SID

www.SID.ir

شباهت را مشخص تر خواهد ساخت.

**سپاسگزاری**

این پژوهش در گروه زیست شناسی دانشکدهٔ علوم دانشگاه شیراز صورت گرفته و لازم می‌دانیم از آقایان علیرضا اسماعیل نژاد شیرازی و علی محمد ذاکری بخاطر همکاریهای تکنیکی و سرکار خانم سوسن صالح‌بیک منشی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان به خاطر تایپ این مقاله تقدیر و تشکر بعمل آوریم.

**منابع**

جهت ملاحظه به صفحات (28-27) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: فرزانه فروهرفر، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم ، دانشگاه اصفهان و دکتر هما رجائی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز

Archive of SID

www.SID.ir